

51

Int. Cl.:

B 01 j, 13/02

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



52

Deutsche Kl.: 12 c, 3

10

11

21

22

43

# Offenlegungsschrift 2 360 384

Aktenzeichen: P 23 60 384.1

Anmeldetag: 4. Dezember 1973

Offenlegungstag: 12. Juni 1974

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 4. Dezember 1972

33

Land: Schweiz

31

Aktenzeichen: 017633-72

54

Bezeichnung: Mikrokapseln im Nanometergrößenbereich und Verfahren zu deren Herstellung

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Speiser, Peter P., Prof., Forch (Schweiz)

Vertreter gem. §16 PatG: Wuesthoff, F., Dr.-Ing.; Pechmann, E. Frhr. von, Dr.;  
Behrens, D., Dr.-Ing.; Goetz, R., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte,  
8000 München

72

Als Erfinder benannt: Speiser, Peter B., Prof. Dr., Forch; Birrenbach, Gerd, Dr.,  
Aesch (Schweiz)

DT 2 360 384

DR. ING. F. WUESTHOFF  
DR. E. v. PROHMANN  
DR. ING. D. BEHRENS  
DIPL. ING. R. GOETZ  
PATENTANWÄLTE

2360384

8 MÜNCHEN 00  
SCHWEIGERSTRASSE 2  
TELEFON (0811) 40 20 51  
TELEX 5 24 070  
TELEGRAMME:  
PROTECTPATENT MÜNCHEN

1A-43 925

## B e s c h r e i b u n g

zu der Patentanmeldung

Professor Peter P. Speiser  
Wassbergstrasse 26, 8127 Forch Schweiz

betreffend

### Mikrokapseln im Nanometergrößenbereich und Verfahren zu deren Herstellung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind neuartige in Wasser kolloidlösliche oder in hydrophoben Medien suspendierbare oder kolloidlösliche Kunststoffkapseln aus gut verträglichem, polymerem Material, insbesondere aus Acrylamid- und N,N'-Methylen-bis-acrylamid-Gel, bzw. aus Acrylsäure- und Acrylsäuremethylester-Gel, von submikroskopischer, vorwiegend mizellarer Größenordnung, welche biologisch oder pharmakodynamisch aktives Material, insbesondere Proteine, Antigene, pharmakologisch oder therapeutische Wirkstoffe oder aber Schädlingsbekämpfungsmittel, Fertilizer, Farbstoffe, Farbbildner, Klebstoffe und Katalysatoren oder andere technische Wirkstoffe in eingeschlossener und/oder adsorbierter Form enthalten, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung und ihrer Verwendung.

Die Herstellung und Verwendung der bekannten Mikrokapseln mit Durchmesser im Bereich von z. B. 0,1 - 1 mm, enthaltend flüssige oder feste Stoffe für medizinische und technische Ver-

- 2 -

409824/0811

wendung wie beispielsweise für die Applikation durch die Haut oder Schleimhaut, zur Geschmacksmaskierung bitterer Medikamente, für magensaftresistente Umhüllungen, zum Schutz von Wirkstoffen gegenüber Umgebungseinflüssen oder zur Einkapselung von Klebstoffen, welche durch Druck oder Temperatur aktiviert werden können, für die Herstellung von Applikationsformen von Schädlingsbekämpfungsmitteln mit Depotwirkung und für die Verkapselung von Farbstoffen<sup>und Farbbildnern</sup> sind gut bekannt. Das Wandmaterial dieser Mikrokapseln besteht meistens aus polymerem, mehr oder weniger wasserunlöslichem Material, etwa Gelatine oder synthetischen Polymeren. Die Mikroverkapselung kann dabei als Aufbauumhüllung in rotierenden Kesseln, Tellern, Scheiben, Walzen usw., sowie im Wirbelschichtbett oder durch Sprühkondensation erfolgen. Ein z.Zt. gebräuchliches Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln ist die sog. "einfache" oder "komplexe" Koazervation (J.Pharm. Sc., 59, 1367 (1970), welche gewöhnlich in 4 Verfahrensschritten erfolgt:

- a) Herstellung einer Emulsion oder Suspension des einzukapselnden Stoffes in einer geeigneten Trägerflüssigkeit, welche bereits das Wandmaterial gelöst enthält.
- b) Erzeugung des Wandmaterials in Form kleiner Tröpfchen in dieser Suspension oder Emulsion durch Phasentrennung oder Zugabe einer weiteren Phase, wobei gegebenenfalls ein Dreiphasensystem gebildet wird.
- c) Umhüllung der einzukapselnden Phase durch die bei b) ausgeschiedenen Tröpfchen aus Wandphasenmaterial.
- d) Verfestigung der zunächst noch flüssigen Hülle.

Während des gesamten Prozesses muß gerührt werden, um das Mehrphasensystem stabil zu halten. Die Bildung der Mikrokapseln erfolgt dabei in der Regel durch Koazervierung von Gelsystemen,

wie sie etwa in den schweizerischen Patentschriften Nr. 330'500 und 373'633, den deutschen Auslegeschriften Nr. 1'256'194 - 1'256'196, den deutschen Patentschriften Nr. 1'180'347, 1'185'585 und 1'189'050, den amerikanischen Patentschriften Nr. 2'800'457, 2'800'458, 3'155'590 und 3'190'837, der britischen Patentschrift Nr. 1'016'839, den belgischen Patentschriften Nr. 699'324, 701'600 und 727'294 und der deutschen Offenlegungsschrift Nr. 1'928'552 beschrieben ist. Die Teilchengröße der nach diesen Verfahren hergestellten Mikrokapseln variiert zwischen einem Minimum von einigen Mikrometern und mehreren 100 Mikrometern und reicht bis zu mehreren Millimetern.

Die Anwendung derartiger Mikrokapseln in der Medizin beispielsweise ist <sup>auf</sup> die orale, kutane, epitheleale und enterale Verabreichung beschränkt. Eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es nun, diese Einschränkung bei der medizinischen Anwendung zu beseitigen und darüberhinaus eine Kapselform zur Verfügung zu stellen, die für viele Anwendungen wesentliche Vorteile besitzt.

Um eine gefahrlose parenterale, inklusiv intravenöse Verabreichung von therapeutisch wirksamen Partikeln sicherzustellen, muß deren Teilchendurchmesser im Mikrometerbereich bis zu mehreren 100 Mikrometern auf wenige hundert Nanometer ( $10^{-9}$  Meter) reduziert werden. Das ist eine Verkleinerung um das 100- bis 10'000fache gegenüber den bekannten Kapseln. Es ist verständlich, daß dazu ein grundsätzlich neues Verfahren erfunden und angewendet werden mußte, damit Teilchen resultieren mit Durchmesser in der Größenordnung kleiner als 200 Nanometer vorwiegend unter 80 nm.

Polymerpartikel mit einem Durchmesser zwischen 10 Mikrometern und 2 mm können durch Suspensionspolymerisation nach dem Verfahren der deutschen Patentschrift Nr. 1'081'228 erhalten werden.

Die kleinsten bisher bekannten Kunststoffpartikel werden erhalten durch Emulsionspolymerisation, bei der das gewöhnlich wasserunlösliche Monomere in wässriger Phase emulgiert wird, die eigentliche Polymerisation jedoch nicht in den Monomerentröpfchen, sondern in der wässrigen Phase erfolgt und bei welcher zum Schluß eine wässrige Dispersion von kugelförmigen Polymerteilchen (Late-teilchen) mit einem Durchmesser von etwa 100 bis mehreren 1'000 Nanometern vorliegen (Fikentscher et al, Angewandte Chemie 72, Seiten 856-864 (1960); Harkins, Journal of Polymer Science, Vol. V, No. 2, Seiten 217-251 (1950) ).

Weder die durch Suspensions- noch durch Emulsionspolymerisation erhaltenen Teilchen sind klein genug, um in Wasser kolloidlöslich zu sein, wohingegen Mikrokapseln mizellarer Größenordnung in Wasser eine stabile kolloide Lösung bilden können.

Aufgrund der Lehre und Erkenntnisse der Emulsionspolymerisation wurde nun die auf den mizellaren Bereich ausgerichtete neue Polymerisationsmethode entwickelt, die zu den erfindungsgemäßen Mikrokapseln führt, die aus einem polymeren Material, vorzugsweise aus einem hydrophilem Gel aus polymerisiertem Acrylamid, Acrylsäure und/oder deren Derivaten bestehen und einen Durchmesser im Nanometerbereich von 20 - 200 nm vorzugsweise unter 80 nm aufweisen und in Wasser kolloidal löslich sind und Wirkstoffe in eingeschlossener und/oder adsorbierter Form enthalten. Das Polymer besitzt vorzugsweise eine poröse Struktur.

dadurch  
Diese Mizellkapseln können hergestellt werden, daß wasserlösliche, polymerisationsfähige Moleküle und das einzuschließende Material, z.B. der biologisch oder pharmakodynamisch aktive Wirkstoff zusammen in Wasser echt oder zumindest kolloidal gelöst werden. Diese wässrige Lösung wird in einer hydrophoben Flüssigkeit, die eine Phase bildet, in welcher die Kunststoffmonomeren und die Wirkstoffe schwer- oder unlöslich sind, mit

Hilfe von grenzflächenaktiven Hilfsstoffen (Tenside) unter Rühren verteilt, so dass winzige Mizellen in der Größenordnung von ca. 20 - 200 Nanometer entstehen, die die polymerisationsfähigen Monomeren, die Wirkstoffe und eventuell weitere Hilfsstoffe enthalten und nun in einem relativ großen Volumen der hydrophoben Phase solubilisiert sind. Sie bilden kleinste Reaktionsräume für die anzuschließende Polymerisation der Monomeren. Diese kann nach an sich bekannten Methoden eingeleitet werden, wie sie z.B. in der deutschen Patentschrift Nr. 1'081'228 oder in den amerikanischen Patentschriften Nr. 2'880'152 und 2'880'153 beschrieben sind. Die Polymerisation ist dabei vorwiegend auf die Mizellarräume beschränkt, da die hydrophobe Hauptphase kein polymerisationsfähiges Material enthält und auch eine Diffusion von Monomeren in und durch diese Phase weitgehend verhindert ist.

Zur Einhüllung von nicht-wasserlöslichen Stoffen kann das System derart verändert werden, daß eine lipophile Phase mit dem gelösten Material und öllöslichen Monomeren in einer hydrophilen Flüssigkeit, meist Wasser, solubilisiert werden. In diesem Falle ist die Diffusion von Monomeren durch die hydrophile Phase weitgehend verhindert.

Im Gegensatz zur Emulsionspolymerisation, bei welcher in den meisten Fällen wasserunlösliche Monomere in Wasser polymerisieren, und bei welcher die radikalhaltigen, polymerisierenden Reaktionszentren anschwellen können auf ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe - bedingt durch Diffusion von Monomeren aus deren Vorrat in den vorhandenen Emulsionströpfchen in die wachsenden Polymer-Monomer-Teilchen (Latex-Teilchen) - ist die erfindungsgemäße "Mizellpolymerisation" strikte auf die in den Mizellen enthaltenen Monomeren beschränkt. Die Partikel bleiben daher extrem klein. Durch Variation von Monomeren und Vernetzungsmitteln, deren Konzentration, der Polymerisationsart und Katalysatoren, dem Verhältnis der hydrophoben zur wässrigen Phase

und Wahl der Tenside als Mizellbildner, kann innerhalb der Mizellen eine gesteuerte Vernetzung, ein variables Polymergerüst und damit eine Beeinflussung der spezifischen Einkapselung des aktiven Materials erzielt werden.

Nach Beendigung der Polymerisation wird durch Entfernen oder Einengen der äußeren Phase, z.B. durch Destillation, Ultrafiltration oder Zentrifugierung, der feste Rückstand mit einem geeigneten Lösungsmittel - im allgemeinen mit einem wässrigen Alkohol, z.B. Methanol - verdünnt, wobei die gebildeten Polymerisatteilchen gewöhnlich ausfallen und dann durch Filtrieren oder Zentrifugieren von löslichen Begleitstoffen und vom Emulgator abgetrennt und gewonnen werden kann.

Alternativ dazu kann nach Einstellen der auspolymerisierten Lösung auf einen geeigneten Lösungsmittelgehalt die entstandene Suspension auch direkt ultrafiltriert und das Polymerisat isoliert werden. Das erhaltene Produkt zeigt in beiden Fällen in geeigneten Lösungsmitteln wieder kolloidales Verhalten. Es besteht, wie aus elektronenoptischen Bildern und Freigabeversuchen mit radioaktiv markiertem, einpolymerisiertem Gammaglobulin als Wirkstoff hervorgeht, aus polymeren Kügelchen von weniger als 200 nm, vorzugsweise unter 80 nm Durchmesser, in denen das aktive Material eingeschlossen und/oder adsorbiert ist.

Das neue Verfahren zur Herstellung der Mikrokapseln im Nanobereich, die biologisch oder pharmakodynamisch aktive oder technisch brauchbare Wirkstoffe enthalten, ist erfindungsgemäß durch nachfolgende Verfahrensstufen gekennzeichnet:

1. Die grenzflächenaktiven Hilfsstoffe mit Emulgatorwirkung, welche die Solubilisierung von Wasser und wässrigen Lösungen oder von lipophilem Material - gegebenenfalls in geeigneten

Lösungsmittel - in einer hydrophoben Flüssigkeit, bzw. in einer hydrophilen Flüssigkeit, ermöglichen, werden in der betreffenden Flüssigkeit gelöst, die die hydrophobe oder hydrophile äußere Phase bilden soll.

2. Zu der erhaltenen Lösung wird unter Rühren Wasser und das einzuschließende aktive Material oder die wässrige Lösung des aktiven Materials bzw. das lipophile aktive Material hinzugefügt und dann die Monomere des zu polymerisierenden Polymers eingetragen. Hierbei werden für die Verwendung in der Therapie Monomere verwendet, die ein gutverträgliches Polymer ergeben. Als wasserlösliche Monomere können insbesondere Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-acrylamid und als öllösliche Monomere, vorzugsweise Acrylsäure + Acrylsäuremethylester, verwendet werden. Gegebenenfalls kann in dieser Verfahrensstufe auch so verfahren werden, daß zunächst Wasser und Monomere allein in die hydrophobe emulgatorhaltige Flüssigkeit eingerührt wird, oder es werden lipophiles Lösungsmittel und lipophile Monomere in die hydrophile emulgatorhaltige Flüssigkeit eingetragen, worauf zu der erhaltenen Lösung dann erst die konzentrierte, gegebenenfalls kolloide, wässrige oder ölige Lösung des einzuschließenden aktiven Materials hinzugefügt wird.
3. Die in den solubilisierten, wasserhaltigen, bzw. ölhaltigen Mizellen gelösten Monomeren werden nun je nach anzuwendender Polymerisationstechnik - in an sich bekannter Weise polymerisiert, wobei der Verlauf der Polymerisation durch Titration des Monomergehaltes verfolgt werden kann.
4. Nach Beendigung der Polymerisation wird das erhaltene Polymerisat mit dem eingeschlossenen und adsorbierten, aktiven Material, gegebenenfalls nach Entfernen des Hauptanteils der Flüssigkeit der äußeren, d.h. kontinuierlichen Phase, z.B. durch Abdestillieren im Vakuum, durch Ultrafiltration oder Zentrifugieren isoliert. Durch Zusatz von geeigneten



Lösungsmitteln, vorzugsweise mit wässrigem Alkohol, oder durch Aussalzen kann das Produkt auch ausgefällt werden.

Es wurde festgestellt, daß als Flüssigkeit für die hydrophobe Phase relativ kurzkettige n-Alkane am besten geeignet sind. Sie sind praktisch wasserunlöslich, für die Solubilisierung von Wasser optimal und stellen selbst kein Lösungsmittel für die gewählten Monomeren und die in Frage kommenden biologisch aktiven, <sup>hydrophilen</sup> Wirkstoffe wie Pharmaka oder das andere einzuschließende aktive Material dar. Sie sind außerdem inert, ungiftig und leicht wieder von dem erhaltenen Produkt zu entfernen.

Besonders geeignet sind n-Alkane, welche im Vakuum einen Siedepunkt von weniger als 0°C aufweisen; das sind vor allem n-Hexan und n-Heptan.

|          | Siedepunkt in °C bei: |          |           |
|----------|-----------------------|----------|-----------|
|          | 10 Torr.              | 40 Torr. | 100 Torr. |
| n-Hexan  | - 25                  | - 2,3    | 15,8      |
| n-Heptan | - 2,1                 | + 22,3   | 41,8      |
| Wasser   | + 11,3                | 34,1     | 51,6      |

Es wurde ferner festgestellt, daß die Kombination eines geeigneten nicht-ionogenen Emulgators mit einem ionogenen Emulgator zu einer wesentlich besseren Solubilisierung der wässrigen Phase führt. Mit Hilfe der Kombination kann eine wesentlich größere Menge Wasser mit geringerer Gesamtmenge an Emulgator in der organischen hydrophoben Phase solubilisiert werden.

Als nicht-ionogene Emulgatoren haben sich die Fettalkoholpolyglykoläther bewährt, z.B. Polyäthylenlauryläther mit durchschnittlich 4 Äthylenoxid in der Kette, und als ionogener

Emulgator die Alkalisalze von höheren Sulfobernsteinsäure-bis-alkylestern, z.B. das Natriumsalz des Sulfobernsteinsäure-bis-2-äthylhexylester.

Für die Einhüllung lipophiler Wirkstoffe hat sich eine solubilisierende Mischung aus Tween 80, d.h. Polyoxiäthylensorbitanmonooleat, in beispielsweise Äthyloleat, Paraffin, Rizinusöl oder anderen Fettsäureestern mit Acrylsäurederivaten als Monomere, vorzugsweise Acrylsäure oder Acrylsäuremethylester sowie gegebenenfalls auch mit Vinylderivaten in Wasser bewährt.

Die Polymerisation der Monomeren erfolgt nach an sich bekannten Methoden, <sup>eventuell</sup> nach Zusatz von Katalysatoren oder Polymerisationsinitiatoren, durch Bestrahlung oder durch Kombination chemischer mit physikalischen Methoden, wie sie z.B. in den amerikanischen Patentschriften Nr. 2'875'047, 2'880'152 und 2'880'153 und der deutschen Patentschrift Nr. 1'081'228 beschrieben sind.

Bei der Wahl des Polymerisationsverfahrens und besonders bei der Dosierung der entsprechenden Maßnahmen muß jedoch Rücksicht auf das einzuschließende Material genommen werden. Dieses darf durch das angewandte Verfahren nicht in nennenswertem Ausmaß geschädigt werden. Zu diesem Zwecke sind im Einzelfalle gewisse Anpassungen des Verfahrens vorzunehmen. So ist zu berücksichtigen, daß biologisches Material, wie beispielsweise Antigene, aus empfindlichen Proteinen bestehen, welche beim Erhitzen über 55°C, bei einem pH von weniger als 2,5 oder durch die Einwirkung von Oxydationsmitteln, aus denen die üblichen Polymerisationskatalysatoren bestehen, zerstört werden kann.

Es wurde weiterhin festgestellt, daß in diesen Fällen eine nur minimale Schädigung der Proteine eintritt, wenn die Polymerisation, wahlweise nach einem der folgenden Verfahren

durchgeführt wird. Eine geeignete Method ist die  $\gamma$ -Bestrahlung, z. B. mit einer  $^{60}\text{Co}$ -Quelle, wobei gewöhnlich 0,3 Grad genügen. Hierbei kann im Falle von nicht oxydationsempfindlichem Material auch ein wasserlöslicher Radikalbildner, wie z. B. ein Persulfat, als Polymerisationskatalysator verwendet werden. Dann führt Bestrahlung mit sichtbarem Licht zur Polymerisation, z. B. 300 Watt Glühlampe während ca. 7 Stunden und Riboflavinzusatz (ca. 0,01 %) als Sensibilisator, und gegebenenfalls Kaliumpersulfat-Zusatz ist geeignet. Im Falle der UV. Strahlenverträglichkeit kann auch mit ultravioletttem Licht polymerisiert werden; hier wirkt solubilisiertes Protein sogar beschleunigend auf die Polymerisationszeit. Die Dauer der UV-Bestrahlung mit 70 Watt Tauchlampe bei vorwiegender Wellenlänge : 366nm beträgt ca. 45 Minuten bei Anwesenheit von Protein, sonst ca. 3 Stunden. Alle diese Polymerisationsarten verlagern eine Stickstoffatmosphäre und können bei  $30^{\circ} \pm 5^{\circ}$  und bei wählbarem pH durchgeführt werden.

Nach erfolgter Polymerisation kann die Flüssigkeit der hydrophoben Phase durch Destillation im Vakuum entfernt werden, falls sich die Anwesenheit dieser bei der weiteren Aufarbeitung als nachteilig erweisen sollte. Es bildet sich ein Azeotrop aus der verwendeten hydrophoben Flüssigkeit, z.B. aus n-Hexan und Wasser, welches eine sehr schonende Destillation bei Raumtemperatur oder je nach Vakuum sogar schon bei  $0^{\circ}\text{C}$  erlaubt. Die Gewinnung der Mizellkapseln mit eingeschlossenem aktivem Material erfolgt bei nicht empfindlichem Wirkstoff gewöhnlich direkt durch Ausfällen mit organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, wie z.B. Methanol und anschließende Ultrafiltration oder Filtration über Membranfilter und, falls erwünscht, Vakuumtrocknung des Filterrückstandes. Alternativ ist die Abtrennung des Produktes auch durch Zentrifugation möglich.

Bei Anwesenheit von beispielsweise labilen Proteinen wird mit wässrigem Methanol (40% V/V) in der Kälte ausgefällt und mittels Membranfilter eine Ultrafiltration unter Überdruck durchgeführt. Gegen Ende der Filtration - nach völliger Entfernung der Emulgatoren, der hydrophoben Phase und des größten Teils der methanolischen Lösung wird der Filtrerrückstand mit Wasser auf einen Methanol-Gehalt von ca. 5% verdünnt und anschließend lyophilisiert.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen vorwiegend darin, daß gegenüber bekannten Verfahren ein Produkt erhalten wird, welches Kapseln mit um das 100- bis 10'000fach kleineren Teilchengröße aufweist. Das Produkt zeigt engste Teilchendurchmesserverteilung und ergibt elektronenmikroskopisch das Bild einer Anhäufung von homogenen, kugeligen, annähernd gleich großen Kunststoffpartikeln. Der Durchmesser der polymeren Teilchen (für das Elektron-Scanning-Verfahren mit Gold bedampft) liegt durchschnittlich bei 800 Å (80 nm), wie die scanning photos zeigen. Die untere Teilchendurchmessergrenze beträgt 350 - 200 Å (30 - 20 nm), wie eine Testfiltration mittels Membranfilter: Typ Sartorius SM 11530, Membranfilter GmbH., 34 Göttingen, mittlerer Porendurchmesser 350 - 200 Å gezeigt hat. Die Teilchen bestehen aus dem Polymergerüst, welches die Wirkstoffe mechanisch umhüllt und/oder adsorptiv zurückhält, wobei man - je nach Polarität, Dielektrizitätskonstante und sterischen Gegebenheiten der Reaktionspartner - einen mehr oder weniger schalenförmigen Aufbau des Polymergerüsts oder aber gefüllte, aber poröse Teilchen erhält. Wegen der extrem kleinen Dimensionen der Teilchen sind die erhaltenen Mizellkapseln mit dem eingeschlossenen und adsorbierten aktiven Material in Wasser kolloidlöslich. Dies eröffnet ganz neue Anwendungsmöglichkeiten von therapeutischen Wirkstoffen. Insbesondere erlaubt diese Methode die gefahrlose parenterale Verabreichung, inklusive unter Umständen der intravenösen Injektion, von biologisch und pharmakodynamisch aktivem Material,

wobei je nach Wahl der Mengenverhältnisse zwischen Trägerstoff und aktivem Material, ein mehr oder weniger großer Teil des aktiven Materials in der Netzstruktur der polymerisierten Mizellen mehr oder weniger stark eingeschlossen und adsorbiert ist oder auch teilweise frei und sogleich wirksam vorliegen kann. Damit ist eine gesteuerte Langzeittherapie mit nur einer einzigen Applikation ermöglicht, wobei der Organismus immer nur mit einem Minimum von biologisch oder pharmakodynamisch aktivem Produkt belastet wird. Außerdem kann unter gewissen Bedingungen das netzartig umhüllte Material auch direkt zur Wirkung gelangen; dies gilt besonders bei Antigenen. Auf diese Weise kann ganz besonders bei Impfstoffen eine optimale Adjuvans-Wirkung erzielt werden. Dem Organismus wird über sehr lange Zeit eine äußerst geringe Menge von Antigenen angeboten, wodurch das retikuloendotheliale System ständig zur Antikörperbildung angeregt wird. Daraus resultiert ein stabiler hoher Antikörpertiter und im Endeffekt eine langanhaltende Immunität.

Nicht jedes beliebige aktive Material - Protein, Pharmakon, Schädlingsbekämpfungsmittel, Fertilizer, Farbstoff - ist für die Einbettung in die erfindungsgemäß erhaltenen Mizellnetzstrukturen in gleicher Weise geeignet. Voraussetzung sind jeweils eine bestimmte Molekulargröße und insbesondere die Fähigkeit, mindestens kolloide, wässrige oder ölige Lösungen bilden zu können, da bei der Herstellung die Einbettung in die Mikrokapseln erfolgt, wenn die Wirkstoffe sich in den Mizellen befinden. Gut eignen sich mindestens noch kolloid wasserlösliche oder öllösliche Stoffe mit Molekulargewichten bis zu ca. 150'000.

In vitro konnte für den Fall von radioaktiv markiertem Human-Gammaglobulin in Mizellkapseln über einen Zeitraum von 50 Tagen in einer bewegten Phosphatpufferlösung bei 37°C eine von Beginn der Messung an unveränderte Freigabe von nur ca. 20%

- 13 -

des Gammaglobulins beobachtet werden, was zeigt, daß der größte Teil des Wirkstoffs gut eingekapselt worden ist.

Andererseits zeigen Resultate mit Gammaglobulin in Immunisierungsversuch in vivo an Meerschweinchen, daß sehr bald hohe und relativ lang andauernde Antikörpertiter erhalten werden.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse von Vergleichsversuchen mit herkömmlichem Aluminiumoxid-Adjuvans (Tabelle 1) und mit Freund'schem komplettem Adjuvans (Tabelle 2) gezeigt unter Verwendung von Human-Gammaglobulin. Die Tabelle 3 zeigt Antitoxin Titer, wie sie nach Immunisierung von Meerschweinchen mit verschiedenen Tetanus-Toxoid Präparaten erzielt wurden.

#### TABELLEN

- 14 -

91/31

409824/0811

Immunisierung von Meerschweinchen (subcutan) mit IgG-Präparaten.

Blutungen am 14., 21., 35., 56. und 85. Tag, anschliessende Booster-Injektion = 1. Booster-Injektion am 100. Tag

Tabelle 2

| Gruppe | Präparierung                                      | Dosierung<br>(bezogen<br>auf IgG) | Impfschema<br>(Vaccina-<br>tionstage) |    | mittlerer Titer (Hämagglutinations-Mikrotechnik)<br>Anzahl der Tiere / Standardabweichung |                     |                      |                     | Kommentar                        |
|--------|---|-----------------------------------|---------------------------------------|----|---|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------------------|
|        |   |                                   | 0                                     | 21 | 1. Blutung  | 2. Blutung          | 3. Blutung           | 4. Blutung          |                                  |
| 11     | IgG-Ausgangsmaterial                              | 1 mg/kg                           | +                                     | +  | I : 2,5<br>15 / 9,0   | I : 6,5<br>14 / 6,4 | I : 31<br>13 / 5,8   | I : 7<br>9 / 4,4    | Booster<br>1 mg/kg<br>Ausg.-Mat. |
| 12     | IgG-Ausgangsmaterial<br>+ Kompl.Freund's 1:1      | 1 mg/kg                           | +                                     | +  | I : 51<br>20 / 60   | I : 272<br>17 / 5,3 | I : 1954<br>14 / 4,8 | I : 930<br>10 / 4,6 | Booster<br>1 mg/kg<br>Ausg.-Mat. |
| 13     | Mizellpolymere<br>(116mg)<br>IgG-Ausgangsmaterial | 1 mg/kg                           | +                                     | +  | I : 3<br>15 / 3,6   | I : 3,7<br>13 / 6,0 | I : 55<br>12 / 2,0   | I : 2<br>11 / 13    | Booster<br>1 mg/kg<br>Ausg.-Mat. |

- 15

2360384

Immunisierung von Meerschweinchen (intramuskulär) mit IgG-Präparaten.  
Blutungen am 10., 20., 30. und 60. Tag, anschließende Booster-Injektion =

409824/0811



Tabelle 3

| Gruppe | Präparierung   | Dosierung<br>(Toxoid) | Antitoxin - Titer IE/ml (Bestimmung der I <sup>+</sup> -Dosis an Mäusen)<br>(Anzahl der Tiere im Pool) |   |   |                |
|--------|--|-----------------------|--|---|---|----------------|
|        |  |                       | 1. Blutung   | 2. Blutung  | 3. Blutung                                    | 4. Blutung     |
| 14     | Tetanus Toxoid<br>einpolymerisiert                     | 5 Lf                  | >0,01 <0,05 (5)<br>>0,05 <0,1 (4)<br>>0,05 <0,1 (5)<br>>0,01 <0,05 (5)                                 | >2,0 <5,0 (5)<br>>5,0 <10,0 (5)<br>>1,0 <5,0 (4)  | ca. 2,0 (5)<br>>2,0 <5,0 (4)<br>>2,0 <5,0 (4) | >1,0 <2,0 (10) |
| 15     | Tetanus Toxoid<br>einpolymerisiert                     | 50 Lf                 | >2,0 <5,0 (4)<br>>2,0 <5,0 (5)<br>>5,0 <10,0 (4)<br>>2,0 <5,0 (4)                                      | ca. 10,0 (5)<br>>10,0 <20,0 (4)<br>>5,0 <10,0 (4) | >5,0 <10,0 (6)<br>>5,0 <10,0 (5)              | >2,0 <5,0 (9)  |
| 16     | Tetanus Toxoid<br>einpolymerisiert<br>+ Ausgangstoxoid | 5 Lf<br>5 Lf          | >0,05 <0,1 (4)<br>>0,01 <0,05 (5)  | >2,0 <5,0 (5)                                     | >2,0 <5,0 (5)                                 | ca. 2,0 (4)    |
| 17     | Tetanus Toxoid<br>einpolymerisiert<br>+ Ausgangstoxoid | 50 Lf<br>50 Lf        | >0,5 <1,0 (5)<br>≥ 1,0 (5)   | >2,0 <5,0 (4)<br>>5,0 <10,0 (4)                   | >5,0 <10,0 (4)<br>>5,0 <10,0 (4)              | 5,0 (5)        |
| 18     | Tetanus Toxoid<br>an Al-Phosphat                       | 5 Lf                  | >1,0 <2,0 (5)<br>>0,5 <1,0 (5)<br>>1,0 <2,0 (5)<br>ca. 1,0 (4)   | >5,0 <10,0 (5)<br>ca. 5,0 (5)<br>>5,0 <10,0 (5)   | >5,0 <10,0 (5)<br>>2,0 <5,0 (4)               | >2,0 <5,0 (7)  |
| 19     | Tetanus Toxoid<br>an Al-Phosphat                       | 50 Lf                 | >1,0 <2,0 (5)<br>≥ 1,0 (5)<br>>2,0 <5,0 (5)  | >2,0 <5,0 (5)<br>ca. 10,0 (6)                     | >5,0 <10,0 (5)<br>11,0 (5)                    | >5,0 <10,0 (8) |

Immunisierung von Meerschweinchen (intramuskulär) mit m...

Im folgenden wird die Erfindung an Hand einiger Ausführungsbeispiele näher erläutert; diese gliedern sich in die 3 Arbeitsgänge: a) Solubilisierung, b) Polymerisation, und c) Isolierung und Reinigung.

Beispiel 1

- a) 12,0 g Sulfobernsteinsäure-bis-2-äthyl-hexylester als Natriumsalz (Aerosol OT<sup>®</sup>) und 6,0 g Polyoxiäthylen(4)-lauryläther mit durchschnittlich 4 Äthylenoxid in der Kette (Tensid LA-55-4, der Fa. Hefti AG, Zürich) werden gelöst in 20,0 g n-Hexan; die Lösung wird keimfiltriert. Unter Rühren gibt man - im folgenden unter sterilen Bedingungen - 10,0 g wässrige Toxoid-Lösung (Diphtherie- oder Tetanus-Toxoid mit 100 Lf/ml) hinzu, darauf achtend, daß bei langsamer Zugabe und stetem Rühren eine klare Lösung erhalten bleibt. Nach Einbringen von weiteren 20,0 g n-Hexan werden die Monomeren eingerührt und zwar: 0,250 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid und 2,000 g Acrylamid. Bei vollständiger Lösung der kristallinen Bestandteile wird dann mit n-Hexan auf ein Gesamtgewicht von 110,0 g ergänzt.
- b) Die Lösung wird mit Stickstoff überschichtet, dicht verschlossen und bei etwa 20 - 30°C kontinuierlich den Strahlen einer Kobalt-60-Quelle ausgesetzt. Zur Polymerisation genügt eine Dosis von 0,3 Mrad. Das Ende der Polymerisation, d.h. das Verschwinden der Monomeren, kann mit einer acidimetrischen Farbtitrationsmethode zur Bestimmung von  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Verbindungen mittels Reaktion mit Morpholin geprüft werden (F.E. Critchfield, G.L. Funk, J.B. Johnson; Analyt. Chem. 28, 76-79, 1956).

- c) Nach erfolgter Polymerisation wird die hydrophobe Phase, d. h. das n-Hexan, durch schonende Destillation bei Zimmertemperatur und Wasserstrahlvakuum entfernt. Die zurückbleibende konzentrierte, wässrige Lösung von Produkt und Tensid wird durch Ultrafiltration mit dest. Wasser (Membran: Amicon PM 30) und Stickstoff-Überdruck (ca. 2 - 4 atm) von Tensiden gereinigt. Man erhält eine kolloide wässrige Lösung des Produktes, welches lyophilisiert wird.

### Beispiel 2

- a) 12,0 g Aerosol OT<sup>®</sup> und 6,0 g LA-55-4 werden klar gelöst in 80,0 g n-Hexan, 5,0 g dest. Wasser darin tropfenweise solubilisiert und die kristallinen Monomeren 0,250 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid und 2,000 g Acrylamid zur Lösung gebracht. Die Lösung wird keimfiltriert. Tropfenweise fügt man, unter sterilen Bedingungen, 5,0 g Tetanus-Toxidlösung mit 3'100 Lf/ml hinzu.
- b) Die Polymerisation wurde, wie im Beispiel 1 beschrieben, durch  $\gamma$ -Bestrahlung durchgeführt.
- c) Nach erfolgter Polymerisation kann das polymere Produkt mit eingeschlossenem Antigen schonend bei -5°C mit 40%igem wässrigem Methanol ausgefällt werden. Anschließende Zentrifugation oder Ultrafiltration bei -5°C befreit von den Tensiden. Lyophilisation (Methanolgehalt vorzugsweise mit Wasser unter 5 % eingestellt) oder Ultrafiltration mit Wasser entfernt andere Lösungsmittel und ergibt das gewünschte Produkt.

### Beispiel 3

- a) 45,0 g Aerosol OT<sup>®</sup> und 25,0 g LA-55-4 werden gelöst in 215,0 g n-Hexan. In folgender Reihenfolge werden weiter eingebracht und klar gelöst: 2,5 g Aethanol, 2,5 g Methanol, 40,0 g dest. Wasser, 1,000 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid

und 8,000 g Acrylamid. Die solubilisierete Mischung wird keimfiltriert, das Gewicht mit n-Hexan auf 340,0 g gebracht. Unter Rühren und im folgenden sterilen Bedingungen werden dann 10,0 g einer Human-Gammaglobulin-Lösung (aggregatfrei in Tris-HCl + NaCl 0,100 g; ca. 1,4% Human IgG) tropfenweise solubilisiert.

- b) Die Polymerisation wurde, wie im Beispiel 1 beschrieben, durch  $\gamma$ -Bestrahlung durchgeführt.
- c) Die Isolierung der Mizellkapseln kann entsprechend Beispiel 1 oder Beispiel 2 erfolgen.

#### Beispiel 4

- a) 12,0 g Aerosol OT<sup>®</sup> und 6,0 g LA-55-4 werden gelöst in 80,0 n-Hexan, unter Rühren langsam 35,0 g dest. Wasser solubilisiert und die kristallinen Monomeren 0,500 g N,N'-Methylen-bis acrylamid und 4,000 g Acrylamid darin zur Lösung gebracht. Die Lösung wird keimfiltriert und 0,300 g Urease (lyophilisiertes Produkt, wasserlöslich, "Merck") mizellar gelöst.
- b) Die erhaltene Lösung wird im zylinderförmigen Reaktionsgefäß unter Rühren und Temperaturkonstanz von  $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$  und ständig durch die Lösung perlendem Stickstoffstrom von innen durch eine Ultraviolett-Eintauchlampe (Quarzbrenner, 70 W) 45 Minuten lang bestrahlt bis zum Verschwinden der Monomeren.
- c) Nach erfolgter Polymerisation wird die Lösung im Überschuß mit Methanol nicht unter 80% Alkoholgehalt versetzt. Das Produkt fällt aus und kann abzentrifugiert oder unter Druck abfiltriert und gewaschen werden.

Beispiel 5

- a) Zu einer Lösung von 5,0 g Toluol, 50 mg Diäthyl-p-nitro-phenyl-monothiophosphat und 10,0 g Polyoxyäthylen-sorbitan-mono-oleat (Tween 80) wurde unter Rühren 50 g Wasser hinzugefügt. In diese Lösung werden 1,5 g Acrylsäure-methylester eingerührt.
- b) In die Lösung werden in einem zylinderförmigen, thermostatisierbaren, doppelwandigen Reaktionsgefäß aus Pyrex-Glas (lichte Weite 6 cm) unter Rühren 0,2 mg Riboflavin 5'-Natriumphosphat und 0,2 mg  $K_2S_2O_8$  gelöst. Unter beständigem Rühren und Temperaturkonstanz von  $35 \pm 5^\circ C$  und ständig durch die Lösung perlendem Stickstoffstrom wird die Lösung von außen auf mittlerer Höhe der Flüssigkeitssäule im Abstand von 15 cm mit einer Glühbirne Osram (300 W) 7 Stunden lang bestrahlt bis zum Verschwinden der Monomeren.
- c) Die Isolierung der Mizellkapseln mit dem insektiziden Wirkstoff wurde gemäß Beispiel 4 vorgenommen.

PATENTANSPRÜCHE

409824/0811

## P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Mikrokapseln aus polymerem Material mit eingeschlossenen und/oder adsorbierten Wirkstoffen, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß die Kapseln einen Durchmesser von mizellarer Größenordnung von 20 - 200 Nanometer aufweisen und in Wasser kolloidal löslich sind.
2. Mikrokapseln nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß das polymere Material poröse Struktur aufweist.
3. Mikrokapseln nach Anspruch 1 oder 2, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß das polymere Material ein Gel, vorzugsweise aus polymerisiertem Acrylamid, N,N'-methylen-bis-acrylamid, aus Acrylsäure und/oder deren Derivaten ist.
4. Mikrokapseln nach Anspruch 1 bis 3, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß der mittlere Kapseldurchmesser unter 80 Nanometer beträgt.
5. Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln nach Anspruch 1 bis 4, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß man
  - a) grenzflächenaktive Hilfsstoffe mit Emulgatorwirkung in einer hydrophoben oder hydrophilen Flüssigkeit löst, um innere mizellare Reaktionsräume zu bilden, dann
  - b) zu der Hilfsstofflösung im Falle der Verwendung einer hydrophoben Flüssigkeit als äußere Phase Wasser und den einzuschließenden Wirkstoff bzw. eine wässrige Lösung des Wirkstoffs oder im Falle der hydrophilen Flüssigkeit als äußere Phase ein hydrophobes Lösungsmittel und den Wirkstoff bzw. die Lösung des Wirkstoffs unter Rühren hinzufügt und so rührt, daß die Teilchengröße der diskontinuierlichen Phase unter 200 Nanometer beträgt,

409824/0811

worauf man

- c) die in den Mizellinneren löslichen Monomeren unter Rühren einträgt,
- d) die mizellar gelösten Monomeren in an sich bekannter Weise gegebenenfalls mit Hilfe von Initiatoren oder Katalysatoren polymerisiert und dann
- e) die erhaltenen Mikrokapseln mit dem eingeschlossenen und adsorbierten Wirkstoff durch Ultrafiltration oder Zentrifugieren isoliert, nachdem gegebenenfalls der Hauptteil der hydrophoben Flüssigkeit durch Destillation im Vakuum entfernt und/oder die Mikrokapseln durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln bzw. durch Salzzugabe ausgefüllt wurden.

6. Abwandlung des Verfahrens nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst Monomere mit Lösungsmittel allein in die Hilfsstofflösung der hydrophilen oder hydrophoben Flüssigkeit einrührt und dann zu dieser solubilisierten Lösung eine Lösung des Wirkstoffs hinzufügt, worauf man die Polymerisierung durchführt und die Mikrokapseln isoliert.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als Monomere Acrylamid, N,N'-Methylen-bis-acrylamid, Acrylsäure oder Acrylsäuremethylester verwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als hydrophobe Flüssigkeit N-Alkane, welche im Vakuum bei Temperaturen unter 0°C sieden, vorzugsweise N-Hexan oder N-Heptan verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als hydrophobe Flüssigkeit Paraffin-Äthyloleat, Rizinusöl oder andere pflanzliche Öle verwendet.

409824/0811

